

REC'D 11 MAY 2005	
WIPO	PCT

Mod. C.E. - 1-4 7

IB/05/00484



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

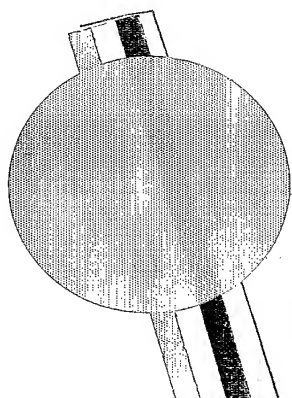


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000357 ✓**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li. **17 APR. 2005**



IL FUNZIONARIO

Paola Giuliano
.....
Dr.ssa Paola Giuliano

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° MI 2004 A 0 0 0 3 5



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	ANIDRAL S.r.l.		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 01092820032
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via Pietro Custodi, 12 - 28100 Novara NO		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	R	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)	
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	Metodo per ridurre le aflatoossine nei mangimi, nelle carni, nel latte e derivati e composizione atta allo scopo		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	MOGNA, Giovanni
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	STROZZI, Gian Paolo
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITÀ

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1				
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	Dr. T. Santoro (Inscr. 537)				

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM) ed altri
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	MARIETTI, GISLON e TRUPIANO S.r.l.
INDIRIZZO	I3	Via Larga, 16
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 Milano
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	Si allega una Dichiarazione Sostitutiva

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO N. ES. ALL. N. ES. RIS. N. PAG. PER ESEMPLARE

PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.

(OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)

DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN

DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)

DESIGNAZIONE D'INVENTORE

DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE
IN ITALIANO

AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE

1

0

1

0

0

(SI/NO)

LETTERA D'INCARICO

SI

PROCURA GENERALE

NO

RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE

NO

(LIRE/EURO)

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO

EURO

Duecentonovantuno/79

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI

PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)

DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA

AUTENTICA? (SI/NO)

SI

SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL
PUBBLICO? (SI/NO)

NO

DATA DI COMPILAZIONE

27/02/2004

FIRMA DEL/DEI

RICHIEDENTE/I

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

C.C.I.A.A. DI

IN DATA

LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.

N. ANNOTAZIONI VARIE
DELL'UFFICIALE ROGANTE

MI 2004 A 0 0 0 3 5 7 ✓

MILANO

27/02/2004 ✓

, IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO

FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPOSTATO.

Cod. 15

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

[Signature]



ROSA SOGLIO

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA: **MI 2004 A 0 0 0 3 5 7** DATA DI DEPOSITO: **27/02/2004**

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO

ANIDRAL S.r.l.
Via Pietro Custodi, 12
28100 Novara NO

C. TITOLO

Metodo per ridurre le aflatossine nei mangimi, nelle carni, nel latte e derivati e composizione atta allo scopo

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

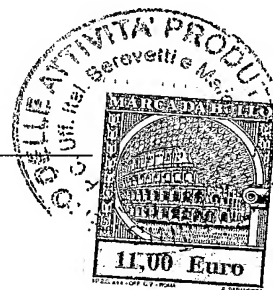
SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

L'invenzione concerne un metodo per ridurre drasticamente e/o eliminare le aflatossine nei mangimi, permettendo in tal modo di produrre carne e latte esente da aflatossine, attraverso l'uso di specifici batteri lattici che eliminano la presenza di muffe nei mangimi destinati all'alimentazione di bovini e la conseguente contaminazione da aflatossine nella carne, nel latte e negli alimenti da questo derivati; l'invenzione fornisce anche una composizione atta allo scopo.

P. DISEGNO PRINCIPALE



FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

Dr. T. Santoro (Isr. 537)

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA: **MI 2004 A 0 0 0 3 5 7** DATA DI DEPOSITO: **27/02/2004**

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO

ANIDRAL S.r.l.
Via Pietro Custodi, 12
28100 Novara NO

C. TITOLO

Metodo per ridurre le aflatossine nei mangimi, nelle carni, nel latte e derivati e composizione atta allo scopo

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

O. RIASSUNTO

L'invenzione concerne un metodo per ridurre drasticamente e/o eliminare le aflatossine nei mangimi, permettendo in tal modo di produrre carne e latte esente da aflatossine, attraverso l'uso di specifici batteri lattici che eliminano la presenza di muffe nei mangimi destinati all'alimentazione di bovini e la conseguente contaminazione da aflatossine nella carne, nel latte e negli alimenti da questo derivati; l'invenzione fornisce anche una composizione atta allo scopo.

P. DISEGNO PRINCIPALE



FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

Dr. T. Santoro (Isr. 537)

Descrizione dell'invenzione che ha per titolo:

"Metodo per ridurre le aflatossine nei mangimi, nelle carni, nel latte e derivati e composizione atta allo scopo"

a nome ANIDRAL S.r.l., di nazionalità italiana,

5 con sede in 28100 Novara NO

Inventori: MOGNA, Giovanni; STROZZI, Gian Paolo MI 2004 A 0 0 0 3 5 7

** ** *

La presente invenzione concerne un metodo per ridurre drasticamente e/o eliminare le aflatossine nei mangimi, permettendo in tal modo di produrre carne e latte esente da aflatossine. In particolare il metodo dell'invenzione prevede l'uso di specifici batteri lattici per eliminare o almeno ridurre in modo consistente la presenza di muffe nei mangimi destinati all'alimentazione di bovini e la conseguente contaminazione da aflatossine nella carne, nel latte e negli alimenti da questo derivati. L'invenzione concerne anche una composizione atta a realizzare il metodo dell'invenzione.

CONTESTO DELL'INVENZIONE

Le micotossine sono sostanze contaminanti, prodotte da muffe, assai diffuse negli alimenti e nei prodotti zootecnici; la contaminazione da parte delle muffe può essere primaria quando avviene nei campi in fase di coltivazione, ovvero secondaria quando interviene in una delle fasi successive (raccolta, essiccazione, conservazione, trasformazione, trasporto, ecc.).

Il fenomeno riveste importanza planetaria, tanto è che la FAO nel 1985 ha stimato che nel mondo fosse contaminato circa il 25% delle derrate alimentari.

I principali fattori che determinano ed influenzano la produzione di micotossine sono:



➤ Fattori intrinseci:

- il livello iniziale di contaminazione in spore fungine dell'alimento, che influenza la quantità di tossine sintetizzabili (più muffe, maggior quantità potenziale di micotossine);
- il tipo di specie fungina contaminante, che determina le classi di micotossine prodotte;
- il potenziale tossigeno, molto diverso nell'ambito di ceppi appartenenti ad una stessa specie.

➤ Fattori estrinseci:

- le condizioni ambientali ed ecologiche generali;
- specifici fattori chimici, fisico-chimici e fisici dell'alimento, quali umidità, acqua libera (a_w), temperatura, natura del substrato, pressione parziale di ossigeno, che influenzano lo sviluppo fungino e di conseguenza la produzione di micotossine;
- fattori biologici, essenzialmente riconducibili alla competizione esercitata sulle muffe dalla microflora naturale presente nell'alimento od eventualmente aggiunta al fine di pilotare la fermentazione in senso favorevole alla conservazione dell'alimento stesso.

Tra le circa 800 micotossine classificate, le aflatossine rappresentano la tipologia a maggior tossicità per gli animali e l'uomo; il gruppo al momento comprende 18 diverse sostanze a varia tossicità con effetti a carico del fegato, rene, sistema nervoso a seguito di esposizione per ingestione, contatto cutaneo ed inalazione.

Sono prodotte essenzialmente da *Aspergillus flavus* (ubiquitario), *Aspergillus parasiticus* (più frequente nei climi subtropicali e tropicali) e *Aspergillus nonius* (più



raro).

Le aflatossine più frequenti nelle derrate alimentari sono la B1, B2, G1 e G2.

La più pericolosa è l'aflatossina B1, classificata dallo IARC (International Agency for Research on Cancer) come cancerogena, in quanto, oltre ad esplicare
5 azione diretta, viene metabolizzata nell'organismo animale e trasformata in aflatossina M1 che passa nel latte passivamente attraverso la membrana cellulare.

Gli alimenti più frequentemente contaminati da aflatossina B1 sono le granaglie, i semi oleosi, i cereali e le leguminose.

L'aflatossina M1, seppure meno tossica del suo precursore B1, è anch'essa
10 classificata come potenzialmente cancerogena.

Quando le vacche ingeriscono alimenti contaminati da aflatossina B1, questa viene trasformata mediante idrossilazione in sede epatica e renale in aflatossina M1, che in piccola parte si deposita nelle carni dell'animale, mentre per la quasi totalità viene successivamente eliminata nel latte.

15 Inizia a comparire nel latte circa 12 ore dall'inizio della somministrazione di alimenti contaminati, raggiungendo la massima concentrazione in circa 24 ore; scompare dopo circa 24-72 ore dalla eliminazione degli alimenti contaminati dalla dieta.

Esiste una correlazione abbastanza precisa tra concentrazione di aflatossina B1
20 nei mangimi usati per i bovini e concentrazione di aflatossina M1 nelle carni e nel latte.

In particolare, è stato calcolato che il tasso di trasferimento tra aflatossina B1 nell'alimento e M1 nel latte è circa 55 : 1 (Frobish, 1986).

25 Tenendo conto che l'aflatossina M1 non viene inattivata dai trattamenti termici, ne deriva che la contaminazione si estende anche a tutti i suoi derivati. I formaggi

Tiziana Santoro

anzi rappresentano per la salute dei consumatori un rischio ancora superiore, presentando una concentrazione di tossina M1 maggiore rispetto a quella del latte di lavorazione; tale fenomeno è dovuto alla particolare affinità chimica dell'aflatossina per le proteine.

5 Episodi di allarmanti contaminazione di latte e derivati sono sempre più frequenti in ogni Paese e risulta pertanto sempre più urgente contrastare drasticamente il fenomeno; poiché gli insilati di mais rappresentano la parte preponderante dell'alimentazione bovina, tale alimento costituisce la fonte primaria della genesi dell'aflatossina M1 in tutta la filiera latte.

10 Si rende pertanto indispensabile interrompere la contaminazione già a partire dalla sua origine.

La normativa relativa alle micotossine presenti negli alimenti destinati all'alimentazione umana (Regolamento CE 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001, qui di seguito solo "Regolamento") stabilisce quale tenore massimo di 15 M1 nel latte crudo, latte alimentare e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte, la concentrazione di 0,05 ppb ($\mu\text{g/Kg}$), mentre il limite imposto dal Regolamento per gli alimenti destinati agli animali da latte è di 5 ppb.

In realtà, in riferimento all'insilato di mais, tale limite dovrebbe essere molto più basso. Infatti considerando il limite di 0,05 ppb nel latte, un consumo di circa 20 20 Kg di insilato / die / capo ed una produzione giornaliera di 30 litri di latte, ne deriva:

$0,05 \text{ ppb} \times 30 \text{ (litri di latte prodotto / die)} = 1,5 \mu\text{g}$ (totale aflatossina M1 eliminata nel latte)

$1,5 \mu\text{g} \times 55 \text{ (tasso di trasferimento)} = 82,5 \mu\text{g}$ (totale aflatossina M1 assunta con la dieta)

25 $82,5 \mu\text{g} : 20 \text{ Kg (quant. media insilato consumato/die)} = 4,1 \text{ ppb (concentraz.)}$





aflat.B1 nell'insilato)

Tenendo però conto che la quantità di latte prodotta può essere inferiore a 30 litri / die, che la quantità di insilato consumato con la dieta può essere maggiore di 20 kg / die e che il fattore di trasferimento nel latte ($B1 \leftrightarrow M1$) può risultare superiore a 55, per rientrare nei limiti imposti dal Regolamento di 0,05 ppb di M1 nel latte con un certo margine di sicurezza, non dovrebbero essere somministrati alle bovine insilati con una concentrazione in B1 superiore a 2,5 – 3 ppb.

Data la pericolosità dell'azione cancerogena-genotossica dell'aflatossina B1 ed in misura minore della M1, è imperativo comunque, al di là dei limiti imposti dal Regolamento, fare in modo che le loro concentrazioni siano ridotte ai più bassi livelli possibili.

Ricerche condotte in Italia ed Europa sugli insilati di mais ceroso hanno evidenziato che la distribuzione in classi dei campioni, in funzione della concentrazione dell'aflatossina B1, è molto disomogenea:

15	~ 28%	< 2 ppb
	~ 12%	2 – 5 ppb
	~ 12%	5 – 10 ppb
	~ 26%	10 – 30 ppb
	~ 22%	> 30 ppb

20 In pratica oltre la metà dei campioni analizzati supera di molto il limite imposto dal Regolamento per i mangimi destinati agli animali da latte (5 ppb) e la situazione è logicamente ancora peggiore in raffronto alla soglia di sicurezza sopra indicata (2,5 – 3 ppb).

25 Una ulteriore osservazione sulla distribuzione delle varie classi indica che le percentuali più alte sono quelle estreme (< 2 ppb e > 10 ppb), a dimostrazione del



fatto che quando nel silo non si instaurano condizioni idonee a contrastare lo sviluppo fungino, il numero di muffe raggiunge valori molto elevati, con conseguente imponente biosintesi di aflatossina B1.

Le specie fungine più diffuse negli insilati, compresi quelli di mais ceroso, sono
5 *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* che hanno come condizioni ottimali di crescita temperature comprese tra i 25 ed i 30 gradi centigradi ed umidità relativa pari o superiore all'85%. Tali condizioni ambientali sono ottimali non solo per la proliferazione delle muffe, ma anche per la produzione dell'aflatossina B1, la cui sintesi decresce fortemente a temperature superiori a 35°C ed inferiori a 15°C.

10 Scopo fondamentale dell'insilamento è di conservare il foraggio per la stagione invernale, limitando la perdita di sostanza nutritiva ed evitando nel contempo che l'insilato assuma caratteristiche nutrizionali ed organolettiche tali da rendere l'impiego scarsamente efficiente sotto il profilo alimentare.

La finalità non è di facile attuazione in quanto, a fronte di una microflora epifita
15 generalmente favorevole, apportata dall'essenza foraggiera, si verifica una inevitabile contaminazione con terra e residui organici inquinati da varie specie microbiche. Alcune possono ridurre o alterare i principi nutrizionali dell'insilato, mentre altre possono essere patogene per l'animale ed indirettamente per l'uomo.

Oltre che negli insilati, si osserva lo sviluppo di muffe anche in altri tipi di
20 mangimi destinati all'alimentazione animale, in particolare nella granella di granturco o mais. La granella può essere "umida" (contenuto di umidità = a circa 24-25%) ed in questo caso ai fini della conservazione si effettua l'insilamento, ovvero "essiccata" (contenuto di umidità inferiore al 13%) ed in tal caso, dopo la raccolta, si effettua l'essiccazione con aria calda fino al raggiungimento del valore di umidità desiderato.

25 Esiste dunque la necessità di ridurre la contaminazione nei mangimi di alcune



specie fungine quali *Aspergillus flavus* e *parasiticus* che sono forti produttori di aflatossine, con particolare riferimento alla B1 e costituiscono pertanto un grave rischio per la salute degli animali che si nutrono con tali mangimi e per l'uomo che assume gli alimenti derivati dai detti animali, in particolare il latte e i prodotti da esso
5 ottenuti ma anche la carne dei detti animali che può contenere l'aflatossina M1 anche se in concentrazioni minori rispetto al latte.

La domanda di brevetto MI2001A002202 descrive un metodo per ridurre il gonfiore butirrico e/o la fermentazione propionica causati dai clostridi e dai batteri propionici nei formaggi a media e lunga stagionatura mediante specifici trattamenti
10 attuati sugli insilati foraggieri destinati all'alimentazione delle bovine da latte.

In particolare la detta domanda di brevetto descrive l'uso di opportuni ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* vantaggiosamente "attivati", intendendosi con questo termine che i lattobacilli sono perfettamente attivi e vitali avendo ultimato il loro ciclo biologico riproduttivo in opportuni substrati liquidi poco prima della
15 distribuzione sul foraggio trinciato.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è di fornire un metodo per l'abbattimento delle aflatossine nei mangimi destinati all'alimentazione animale.

Un altro scopo della presente invenzione è fornire un metodo per l'eliminazione
20 dell'aflatossina M1 nelle carni e nel latte proveniente da allevamenti bovini alimentati con tali mangimi e di conseguenza nei prodotti caseari derivati dal detto latte.

Un altro scopo della presente invenzione è di fornire una composizione per la realizzazione del metodo dell'invenzione.

Tali ed altri scopi sono ottenuti con il metodo dell'invenzione che permette di
25 eliminare o comunque contenere fortemente il numero di spore fungine responsabili

della produzione di micotossine, tra le quali l'aflatossina B1 nei mangimi destinati all'alimentazione animale, con conseguente abbattimento dell'aflatossina M1 nel latte prodotto dalle bovine alimentate con detti mangimi e, naturalmente in tutti i suoi derivati.

5 Si è infatti osservato che addizionando alle essenze foraggiere opportuni ceppi di lattobacilli prima della conservazione dei mangimi destinati all'alimentazione animale si ottiene un formidabile abbattimento del numero di muffe, ivi comprese le specie *Aspergillus flavus* e *parasiticus*.

Così secondo uno dei suoi aspetti, la presente invenzione concerne un metodo
10 per eliminare e/o ridurre il numero di spore fungine responsabili della produzione di micotossine nei mangimi destinati all'alimentazione animale che comprende addizionare le essenze foraggiere destinate alla preparazione dei detti mangimi con almeno un ceppo di lattobacilli scelto nel gruppo costituito da *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e
15 *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019, eventualmente associato a uno o più ceppi di lattobacilli eterofermentanti obbligati.

Nella presente invenzione con i termini "muffe" e "spore fungine" potranno essere indifferentemente utilizzati. Con tali termini si intende designare gli organismi produttori di micotossine.

20 Nella presente descrizione con il termine "micotossine" si intende designare essenzialmente le aflatossine.

Secondo un altro dei suoi aspetti, l'invenzione il metodo dell'invenzione è più specificamente destinato all'abbattimento delle aflatossine nei mangimi derivanti da essenze foraggiere conservate, in particolare l'aflatossina B1.

25 Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, il metodo è destinato



all'eliminazione di aflatossine, in particolare dell'aflatossina M1, nel latte proveniente da allevamenti di bovine alimentate con tali mangimi e di conseguenza nei prodotti caseari derivati dal detto latte.

5 Nella presente descrizione le spore fungine responsabili della produzione di micotossine particolarmente rilevanti sono costituite da muffe, in particolare le specie *Aspergillus flavus* e *parasiticus*.

Nella presente invenzione con l'espressione "essenze foraggiere" si intende un qualsiasi derivato vegetale utile per l'alimentazione animale.

10 Una essenza foraggiera particolarmente vantaggiosa nel metodo della presente invenzione è il mais.

Secondo la presente invenzione, con il termine "mangimi" si intende indicare le essenze foraggiere che sono state sottoposte a trattamenti per la loro conservazione; esempi di mangimi secondo l'invenzione sono gli insilati e la granella di granoturco in tutte le forme disponibili; per "granella" di granoturco (o mais) si intende ad
15 esempio sia la pannocchia intera (tutolo + grani) sia i singoli grani interi o decorticati.

I lattobacilli utilizzati per il metodo della presente invenzione, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019, sono descritti nella domanda di brevetto MI2001A002202 sopra menzionata; vantaggiosamente, secondo la presente
20 invenzione, detti lattobacilli sono usati in forma "attivata" come descritto in tale domanda.

I lattobacilli eterofermentanti obbligati eventualmente presenti possono contribuire a determinare condizioni di anaerobiosi per via della produzione di anidride carbonica.

25 Esempi illustrativi di lattobacilli eterofermentanti obbligati sono quelli

appartenenti alle specie *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides*, più vantaggiosamente sono scelti tra i seguenti ceppi: *Lactobacillus fermentum* I 789, *Lactobacillus brevis* LBR01 e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LcM 04, che sono lattobacilli commercialmente disponibili.

5 Il metodo della presente invenzione permette inoltre di ridurre e/o eliminare il contenuto di aflatossine nella carne degli animali nutriti con i mangimi trattati.

Per l'attuazione del metodo della presente invenzione, di norma si distribuisce uno o più ceppi dei lattobacilli sopra menzionati sulle essenze foraggiere prima della loro trasformazione in mangimi secondo l'invenzione.

10 Nella pratica, i ceppi di lattobacilli, vantaggiosamente diluiti con acqua, sono sparsi per irrorazione sui vari strati di essenze foraggiere, prima della loro conservazione.

Ad esempio, nel caso degli insilati, le essenze foraggiere saranno trattate con i lattobacilli prima della loro compressione, mentre per quel che riguarda ad esempio la
15 granella di granoturco, il trattamento potrebbe essere attuato in modi diversi a seconda del tipo di granella; per la granella umida, in fase di allestimento del silos con le pannocchie e/o con i grani, mentre per la granella essiccata, dopo la raccolta delle pannocchie, prima della fase di essiccazione.

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, si utilizzano
20 almeno due ceppi dei lattobacilli scelti tra i seguenti *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019, vantaggiosamente tre, ancora più vantaggiosamente tutti i ceppi sopra elencati sono utilizzati nel metodo dell'invenzione. L'associazione dei ceppi sopra menzionati con lattobacilli eterofermentanti obbligati può essere vantaggiosa, anche
25 se non strettamente necessaria per gli scopi dell'invenzione.

Si è infatti sperimentalmente osservato che la presenza concomitante di almeno 3-5 dei ceppi sopra riportati nella massa da insilare produce infatti un sorprendente effetto sinergico che induce nel mangime specifiche condizioni di pH, l'anaerobiosi e la secrezione di sostanze ad attività antimicotica, assolutamente sfavorevoli alla germinazione ed allo sviluppo di tutti i germi nocivi, con particolare riferimento alle muffe responsabili della produzione dell'aflatossina B1.

Secondo un'altra forma di realizzazione preferita, le essenze foraggiere sono irrorate con una sospensione di almeno 2 miliardi di lattobacilli per millilitro, vantaggiosamente di circa 5 miliardi di lattobacilli per millilitro o anche più.

Così, a titolo di esempio, per il metodo dell'invenzione, la dose di impiego media per quintale di essenza foraggiera variare da circa 10 a 500 ml della sospensione sopra menzionata, vantaggiosamente intorno a 100 ml.

In ogni caso, indipendentemente dalle modalità di applicazione, la dose di lattobacilli da utilizzare secondo il metodo dell'invenzione deve essere tale da determinare il netto predominio sulla microflora propria ed impropria della massa da conservare ed innescare una immediata ed appropriata fermentazione.

Delle quantità appropriate di lattobacilli sono generalmente comprese tra 50 e 500 miliardi di batteri per quintale di essenza foraggiera, ad esempio circa 100 miliardi di batteri per quintale di essenza foraggiera (1 milione per grammo).

Quantità diverse possono comunque essere utilizzate a seconda del tipo di essenza foraggiera, del terreno e delle condizioni di contaminazione.

I risultati dei saggi effettuati, hanno dimostrato che l'uso della combinazione dei lattobacilli sopra citati nel metodo dell'invenzione consente di realizzare una forte acidificazione già entro le prime ore dal momento della conservazione con conseguente abbassamento del pH molto al di sotto della soglia di 3,80.

Tale condizione, associata ad una buona anaerobiosi, instaurata con una adeguata tecnica di conservazione, in particolare per quel che concerne gli insilati, e migliorata grazie alla produzione di anidride carbonica sviluppata dai ceppi di lattobacilli eterofermentanti, inibisce lo sviluppo di tutti i germi dannosi alla qualità dell'insilato, nocivi alla salute degli animali e, considerando l'intera filiera, patogeni per l'uomo.

In riferimento alle muffe, specificatamente *Aspergillus flavus* e *parasiticus*, i lattobacilli secondo l'invenzione non solo determinano condizioni sfavorevoli al loro sviluppo, ma esercitano una diretta azione di inibizione specifica dovuta alla sintesi di metaboliti ad attività antimicotica.

Quindi il metodo dell'invenzione permette di ottenere mangimi con caratteristiche nutrizionali e chimico-fisiche ottimali per l'alimentazione del bestiame e sicuri dal punto di vista igienico-sanitario sia per gli animali che per i consumatori di latte e derivati.

In particolare la presente invenzione consente di ottenere mangimi quasi completamente privi di aflatossina B1 e, tenendo presente che i mangimi conservati, in particolare insilati, rappresentano la parte preponderante dell'alimentazione delle bovine, ne consegue che il latte prodotto dagli animali alimentati con detti mangimi risulta praticamente esente da aflatossina M1, come la sperimentazione qui di seguito riportata ha confermato.

Secondo un altro dei suoi aspetti, l'invenzione concerne un metodo per la produzione di latte esente da aflatossine, in particolare da aflatossina M1, che comprende alimentare bovine da latte con mangimi ottenuti secondo il metodo dell'invenzione.

Il latte così come i suoi derivati esenti da aflatossine ottenuti con il metodo



dell'invenzione costituiscono un ulteriore oggetto dell'invenzione.

L'uso dei lattobacilli nel metodo dell'invenzione costituisce altresì un oggetto dell'invenzione.

Secondo un altro dei suoi aspetti l'invenzione concerne una composizione di
5 lattobacilli che comprende uno o più dei seguenti lattobacilli: *Lactobacillus*
plantarum LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e
Lactobacillus pentosus LMG P-21019, in combinazione con uno o più lattobacilli
eterofermentanti obbligati, ad esempio scelti tra *Lactobacillus fermentum* I 789,
10 *Lactobacillus brevis* LBR01 e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LcM 04,
destinata al trattamento delle essenze foraggiere secondo il metodo dell'invenzione.

Secondo una forma di realizzazione preferita, la composizione è in forma
anidra, da reidratare prima del suo utilizzo.

In alternativa, la composizione può essere in forma di coltura liquida.

Gli esempi che seguono illustrano l'invenzione e descrivono le prove
15 sperimentali effettuate a dimostrazione dell'attività dei lattobacilli nel metodo
dell'invenzione.

PARTE SPERIMENTALE

Nella parte sperimentale che segue, la composizione secondo l'invenzione,
costituita da coltura riattivata dei ceppi dei lattobacilli, è stata denominata
20 "PRODOTTO".

Tale PRODOTTO sarà anche denominato *Aflasil*.

La sperimentazione condotta con il PRODOTTO ha interessato una significativa
area destinata a mais per un totale di oltre 400 ettari coltivati a mais e con un carico di
circa 3.000 vacche in lattazione presenti in stalla.

25 La quantità totale di mais, raccolto a maturazione cerosa, trinciato ed insilato è



stata di circa 250.000 quintali.

Tutte le prove sono state condotte allestendo in parallelo anche insilati “non trattati” ed insilati “trattati” con colture anidre del commercio, composte da ceppi di lattobacilli aspecifici non riattivati. Sia gli insilati “non trattati” che quelli “trattati con colture aspecifiche” anidre sono stati usati come riferimento.

In sintesi sono stati allestiti i seguenti insilati:

- trincea di mais trattata con **PRODOTTO**;
- trincea di mais trattata con “starters” batterici reperiti in commercio (*controllo*);
- 10 - trincea o cumulo di mais “non trattato” con alcuna coltura batterica (*testimone*).

Ogni dose di PRODOTTO, in forma anidra, è stato riattivato come coltura liquida concentrata (litri 10) il giorno prima dell'utilizzo, diluendolo poi con acqua, a fine riattivazione, al volume finale di 50 litri. In tal modo si facilita e si rende più omogenea la sua dispersione nella massa di trinciato.

Dopo riattivazione e prima della diluizione con acqua, la carica della popolazione batterica della coltura concentrata PRODOTTO è risultata essere sempre superiore a 5 miliardi di lattobacilli per millilitro, con un pH di circa 3,80.

La dose di impiego media per quintale di mais trinciato è stata pari a circa 100 ml. della coltura diluita con acqua; sono stati pertanto aggiunti almeno 100 miliardi di batteri per quintale di insilato (1 milione per grammo) in modo tale da determinare il netto predominio sulla microflora propria ed impropria della massa da insilare ed innescare una immediata ed appropriata fermentazione.

Ogni dose standard di PRODOTTO, corrispondente a litri 10 di coltura liquida riattivata concentrata ed a litri 50 di coltura liquida pronta all'impiego, è stata



pertanto utilizzata per trattare mediamente 500 quintali di insilato.

La somministrazione è stata attuata per irrorazione direttamente sulla massa vegetale all'atto della carica del silo, distribuendo la coltura in ogni strato di trinciato che successivamente è stato sottoposto ad adeguata compressione al fine di stabilire
5 condizioni di appropriata anaerobiosi.

La copertura con teli di plastica resi ben aderenti alla massa di trinciato ed una perfetta sigillatura lungo i bordi della trincea hanno avuto la finalità di assicurare la massima tenuta.

Gli stessi accorgimenti sono stati logicamente adottati anche nell'allestimento
10 dei sili "non trattati" e di quelli "trattati" con colture diverse da PRODOTTO, utilizzate secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Metodi di valutazione degli insilati oggetto della sperimentazione

Tutti gli insilati, trattati e non trattati, sono stati valutati all'atto del desilamento (10-20 gg. max dall'apertura), eseguendo le seguenti indagini analitiche:

15 Valutazioni analitiche eseguite in loco

- aspetto ed appetibilità mediante valutazione visiva e sensoriale:
 - rilevazione dell'odore, colore e consistenza dell'insilato;
 - osservazione di eventuali fattori anomali (cappello, differente stratificazione, presenza macroscopica di muffe , ecc.).
- 20 • rilevazione della temperatura interna (profondità cm. 30 dal taglio) e del prodotto desilato;
- misurazione del pH all'interno della massa.

Valutazioni analitiche eseguite in laboratorio su campionamenti del trinciato prelevato ad una profondità di cm. 20 dalla superficie di taglio

- 25
- analisi della sostanza secca (% s.s.);

Santoro

- determinazione delle Unità Foraggiere (U.F.), espresse per quintale di trinciato tal quale;
- determinazione della concentrazione energetica, espressa in U.F. per Kg di S.S.;
- 5 • determinazione della percentuale dell'azoto ammoniacale sull'azoto totale;
- valutazione del profilo fermentativo (AGV);
- calcolo del punteggio FLIEG;
- rilievi microbiologici: lieviti, muffe, clostridi;
- valutazione della concentrazione delle aflatossine B1, B2, G1 e G2



10 Risultati

Sono stati effettuati n. 82 campionamenti delle tre tipologie di insilati allestiti; in n. 4 casi non è stato possibile preparare né l'insilato *controllo* né quello *testimone*.

I risultati della sperimentazione, espressi come media delle singole valutazioni analitiche, sono riportati nella Tabella 1 che segue e si riferiscono ai trinciati trattati

15 con PRODOTTO, controllo e testimone.

TABELLA 1

<i>Determinazioni analitiche</i>	Insilati trattati con PRODOTTO	Insilati trattati con altre colture (Controllo)	Insilati non trattati (Testimone)
Aspetto	eccellente	buono	variabile
Appetibilità	eccellente	discreta	variabile
Temperatura interna (°C)	18,9	25,5	30,3
Sostanza secca in %	32,7	31,4	29,6

pH al desilamento		3,69	4,18	4,27
Unità Foraggiere per quintale		27,4	24,6	22,5
Concentrazione energetica (U.F./ Kg s.s.)		0,84	0,78	0,76
Percentuale di azoto ammoniacale sull'azoto totale		4,07	4,83	7,17
Acidi grassi in % della s.s.	acido lattico	4,46	3,58	3,06
	acido acetico	1,83	1,73	3,41
	acido propionico	0,11	0,19	0,26
	acido butirrico	tracce	0,11	0,27
Punteggio FLIEG		92	76	32
Valutazione in base al punteggio FLIEG		20% buono 10% molto buono 70% ottimo	30% scadente 40% buono 20% molto buono 10% ottimo	20% pessimo 40% scadente 30% buono 10% molto buono
Analisi microbiologiche	clostridi	45	950	1.100
	lieviti	10^3	10^5	10^6
	muffe	Vedere distribuzione delle classi nello schema 1		
Determinazione delle aflatossine B1 + B2 + G1 + G2		Vedere distribuzione delle classi nello schema 2		

Schema 1: Distribuzione in classi di merito degli insilati in funzione del numero di muffe

❖ **Trattamento con *PRODOTTO* :**

5 n. 28 (93%) < 10^1 UFC/g

n. 2 (7%)	$> 10^1$	$< 10^3$ UFC/g
n. 0	$> 10^3$	$< 10^5$ UFC/g
n. 0	$> 10^5$	$< 10^7$ UFC/g

❖ **Trattamento "Controllo":**

5	n. 2 (8%)		$< 10^1$ UFC/g
	n. 8 (31%)	$> 10^1$	$< 10^3$ UFC/g
	n. 16 (61%)	$> 10^3$	$< 10^5$ UFC/g
	n. 0	$> 10^5$	$< 10^7$ UFC/g

❖ **Nessun trattamento "Testimone":**

10	n. 1 (4%)		$< 10^1$ UFC/g
	n. 8 (31%)	$> 10^1$	$< 10^3$ UFC/g
	n. 3 (11%)	$> 10^3$	$< 10^5$ UFC/g
	n. 14 (54%)	$> 10^5$	$< 10^7$ UFC/g

Schema 2: Distribuzione in classi di merito degli insilati in funzione della concentrazione delle aflatossine (B1 + B2 + G1 + G2) determinate mediante metodo immunochimico con anticorpi policlonali. (Kit ELISA Ridascreen® aflatoxin total – r-Biopharm) con limite minimo di rilevabilità pari a ~1,75 ppb

❖ **Trattamento con *PRODOTTO* :**

20	n. 28 (93%)		$< 1,75$ ppb
	n. 2 (7%)	$> 1,75$ ppb	$< 5,00$ ppb
	n. 0	$> 5,00$ ppb	$< 20,00$ ppb
	n. 0		$> 20,00$ ppb

❖ **Trattamento "Controllo":**

25	n. 4 (15%)		$< 1,75$ ppb
----	------------	--	--------------



n. 11 (42%)	> 1,75 ppb	< 5,00 ppb
n. 10 (39%)	> 5,00 ppb	< 20,00 ppb
n. 1 (4%)		> 20,00 ppb

❖ **Nessun trattamento "Testimone":**

5	n. 1 (4%)		< 1,75 ppb
	n. 12 (46%)	> 1,75 ppb	< 5,00 ppb
	n. 5 (19%)	> 5,00 ppb	< 20,00 ppb
	n. 8 (31%)		> 20,00 ppb

Eliminazione dell'aflatossina M1 nel latte

10 Nonostante sia universalmente noto che l'aflatossina M1 derivi da una trasformazione dell'aflatossina B1 nell'organismo animale e che pertanto somministrando alimenti privi di B1 si ottenga latte esente da M1, si è voluto comunque verificare tale fenomeno con prove in campo.

15 Dove erano stati allestiti insilati trattati con **PRODOTTO**, non trattati (Testimone) e trattati con prodotti diversi da **PRODOTTO** (Controllo) sono stati identificati n. 3 gruppi di vacche alimentate con le tre tipologie di insilato.

20 Dopo una settimana di alimentazione differenziata, campioni di latte di massa provenienti dai 3 gruppi sono stati analizzati per la presenza di M1 mediante metodo immunochimico con anticorpi monoclonali. (Kit ELISA Ridascreen® aflatoxin M1 – r-Biopharm) con limite minimo di rilevabilità pari a 0,005 ppb (5 ppt), cioè 10 volte più sensibile del limite massimo consentito in Italia.

La distribuzione in classi di merito del latte, in funzione della concentrazione di M1, è illustrata nello schema 3 seguente:

Schema 3:

25 ❖ **Vacche alimentate con insilato trattato con *PRODOTTO* :**

Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

	n. 23 (77%)		< 0,010 ppb
	n. 6 (20%)	> 0,010 ppb	< 0,025 ppb
	n. 1 (3%)	> 0,025 ppb	< 0,050 ppb (limite imposto dal Regolamento)
	n. 0	> 0,050 ppb	< 0,080 ppb
5	n. 0		> 0,080 ppb
❖ Vacche alimentate con insilato trattato con altri prodotti "Controllo":			
	n. 4 (15%)		< 0,010 ppb
	n. 6 (23%)	> 0,010 ppb	< 0,025 ppb
	n. 4 (15%)	> 0,025 ppb	< 0,050 ppb (limite imposto dal Regolamento)
10	n. 9 (35%)	> 0,050 ppb	< 0,080 ppb
	n. 3 (12%)		> 0,080 ppb
❖ Vacche alimentate con insilato non trattato "Testimone":			
	n. 0		< 0,010 ppb
	n. 1 (4%)	> 0,010 ppb	< 0,025 ppb
15	n. 8 (31%)	> 0,025 ppb	< 0,050 ppb (limite imposti dal Regolamento)
	n. 7 (27%)	> 0,050 ppb	< 0,080 ppb
	n. 10 (38%)		> 0,080 ppb



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per eliminare e/o ridurre il numero di muffe responsabili della produzione di micotossine nei mangimi caratterizzato dal fatto di aggiungere le essenze foraggiere destinate alla preparazione dei detti mangimi con almeno un
5 ceppo di lattobacilli scelto nel gruppo costituito da *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019, eventualmente in associazione con uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti lattobacilli
10 eterofermentanti obbligati sono scelti tra quelli appartenenti alle specie *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides*.
3. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detti lattobacilli eterofermentanti obbligati sono scelti tra i seguenti ceppi: *Lactobacillus fermentum* I 789, *Lactobacillus brevis* LBR01 e *Leuconostoc mesenteroides*
15 subsp. *cremoris* LcM 04.
4. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che dette micotossine sono l'aflatossina B1.
5. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 4, caratterizzato dal fatto che le dette muffe sono del genere *Aspergillus*.
- 20 6. Metodo per la produzione di latte bovino esente da aflatossina M1 caratterizzato dal fatto di alimentare le bovine da latte con mangimi preparati da essenze foraggiere trattate con almeno un ceppo di lattobacilli scelto nel gruppo costituito da *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019, eventualmente
25 in associazione con uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati.

Santoro

7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che si utilizzano almeno due o più dei detti lattobacilli, eventualmente in associazione con uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati.
8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che i detti lattobacilli sono addizionati alle essenze foraggiere in una dose di impiego media per quintale di essenza foraggiera che varia da circa 50 a circa 500 miliardi di batteri.
9. Metodo secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto che la detta dose è di circa 100 miliardi di batteri per quintale di essenza foraggiera.
10. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che i detti lattobacilli sono utilizzati in coltura liquida.
11. Uso di almeno un lattobacillo scelto nel gruppo costituito da *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019, eventualmente in associazione con uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati, per eliminare e/o ridurre il numero di spore fungine responsabili della produzione di micotossine nei mangimi.
12. Uso secondo la rivendicazione 11 caratterizzato dal fatto che detti mangimi sono insilati.
13. Uso secondo la rivendicazione 11 caratterizzato dal fatto che detti mangimi sono granella, in tutte le sue forme disponibili.
14. Uso secondo le rivendicazioni da 11 a 13, per la produzione di latte e carni bovine esenti da aflatossine.
15. Uso secondo le rivendicazioni da 11 a 14, caratterizzato dal fatto che si utilizzano contemporaneamente tutti i detti lattobacilli, eventualmente in associazione con uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati.



16. Uso secondo le rivendicazioni 14, caratterizzato dal fatto che la detta aflatossina è l'aflatossina M1.
17. Latte e derivati esenti da aflatossine, ottenuti con il metodo delle rivendicazioni da 6 a 10.
- 5 18. Latte e derivati esenti da aflatossina M1, ottenuti con i metodo delle rivendicazioni da 6 a 10.
19. Composizione di lattobacilli che comprende uno o più lattobacilli scelti nel gruppo che consiste in *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 e *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019 in
10 associazione con uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati, destinata al trattamento delle essenze foraggiere.
20. Composizione secondo la rivendicazione 19 caratterizzata dal fatto che detti uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati sono scelti tra quelli appartenenti alle specie *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc*
15 *mesenteroides*.
21. Composizione secondo la rivendicazione 20 caratterizzata dal fatto che detti uno o più lattobacilli eterofermentanti obbligati sono scelti nel gruppo costituito da *Lactobacillus fermentum* I 789, *Lactobacillus brevis* LBR01 e *Leuconostoc* *mesenteroides* subsp. *cremoris* LcM 04.
- 20 22. Composizione secondo le rivendicazioni da 19 a 21 in forma anidra.
23. Composizione secondo le rivendicazioni da 19 a 21 in forma di coltura liquida.
24. Uso della composizione secondo le rivendicazioni da 19 a 21 per eliminare e/o ridurre il numero di muffe responsabili della produzione di micotossine nei mangimi.
- 25 25. Uso secondo la rivendicazione 24 in cui detti mangimi sono insilati.

Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

Santor

26. Uso secondo la rivendicazione 24 in cui detti mangimi sono granella, in tutte le sue forme disponibili.
27. Uso della composizione secondo le rivendicazioni da 19 a 21 per la produzione di latte e carni bovine esenti da aflatossine.

5

Santor

Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

